第6卷第2期　　动物学研究　　Vol.6, No.2
1985年5月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　May, 1985

大熊猫(*Ailuropoda melanolenca*)显带染色体的研究

陈文元　王喜忠　王子淑　　何光昕　叶志勇
(四川大学生物系　成都)　　(成都市动物园)

关键词　大熊猫　显带染色体　珍稀动物

大熊猫系我国特产的世界珍稀动物，素有"活化石"和"国宝"之称。限于材料来源，虽有核型的少数报道（邓承宗等，1980；陈文元等，1984；Newnham *et al.*，1966），但研究尚不够深入。1980年，Wurster-Hill 和 Bush首先报道了大熊猫（♂）的显带核型，并与杂交熊等比较，探讨了大熊猫的分类地位。本文对四只大熊猫的G带、C带核型和 Ag-NORs 作了分析，绘制了G带核型模式图，并提出了某些商榷的意见。

材料和方法

(一) 实验动物

大熊猫共4只（2♂，2♀），均来自成都市动物园。

(二) 血培养及染色体标本制备

外周血0.4—0.5毫升接种在人工培养基中〔RPMI—1640 4毫升，小牛血清1毫升，ConA (sigma) 0.2毫克，肝素、抗菌素适量〕。在38°C温箱中培养58小时。培养终止前6小时加秋水仙素，最终浓度为0.02微克/毫升。0.4% KCl溶液低渗，按常规空气干燥法制片。

(三) 染色（四川大学生物系细胞研究室，1984）

1.G带

按 Wang 和 Fedoroff (1972) 方法，稍加改变。

1）片龄2—7天的染色体标本制片，在37°C温箱内预处理3—24小时。

2）在0.25%胰蛋白酶溶液〔25毫克胰蛋白酶(川大生化教研室制品)，溶于50毫升GKN溶液（1克葡萄糖，0.4克KCl，8克NaCl，0.35克$NaHCO_3$，加蒸馏水至1000

本文1984年9月4日收到。

毫升），50毫升 Versene 溶液（8克 NaCl, 0.2克 KH_2PO_4, 0.2克 KCl, 1.55克 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0.6克 $NaHCO_3$, 加蒸馏水至1000毫升)〕内处理30—40秒。

3）在GKN溶液中漂洗30秒。

4） 2％ Giemsa—0.067*M*磷酸缓冲液（pH6.8）染色10—15分钟。

5）自来水冲洗，空气干燥，镜检。

2.C带

按 Sumner (1972)方法改进。片龄7天左右的染色体标本制片，按下列程序处理：

1） 5％$Ba(OH)_2$溶液，50°C处理10分钟。

2）0.1*N* HCl 漂洗。

3）蒸馏水漂洗后，以各级酒精脱水。

4）65°C 2xSSC（0.3*M*氯化钠＋0.03*M*柠檬酸三钠）溶液处理1小时。

5）0.067*M*磷酸缓冲液（pH6.8）漂洗。

6）1：40 Giemsa—磷酸缓冲液（pH6.8）染色15—20分钟。

7）流水冲洗，空气干燥，镜检。

3.Ag—NORs

采用 Bloom (1976) 等人 Ag—I 方法稍加改进。在染色体标本制片上滴加50％的 $AgNO_3$ 溶液数滴，加盖片后放湿润密闭的培养皿内，65°C温箱中过夜。取出后流水冲洗，再用2％Giemsa—磷酸缓冲液（pH6.8）染色1—2分钟，流水冲洗，空气干燥，镜检。

结　果

大熊猫二倍染色体数为 2n＝42，其核型（陈文元等，1984）包括12对中着丝粒染色体，4对亚中着丝粒染色体，4对近端着丝粒小染色体，以及2个性染色体，X染色体大小介于第6－7对染色体之间，为亚中着丝粒染色体，Y染色体比 No.18 染色体稍大，为近端着丝粒染色体。

（一）G带核型〔图1、2〕（共分析四个个体20个细胞）

No.1 染色体　为中着丝粒染色体。短臂远侧有三条强带，末端为一条中强带、中部有一条较宽的中强带，近侧有一条较宽的强带，一条阴性带，近着丝粒处有一条窄的强带。长臂近侧有一条中强带，两条强带，中部有一条较宽的阴性带，远侧有一条强带一条中强带，在强带与中强带之间有一条阴性带。

No.2 染色体　为中着丝粒染色体。短臂中部有两条强带，远侧有一条较宽的中强带，近侧有一条中强带。长臂近侧有两条强带，中部有两条中强带，远侧有两条强带，

注：图1中XY染色体来自另一个细胞。

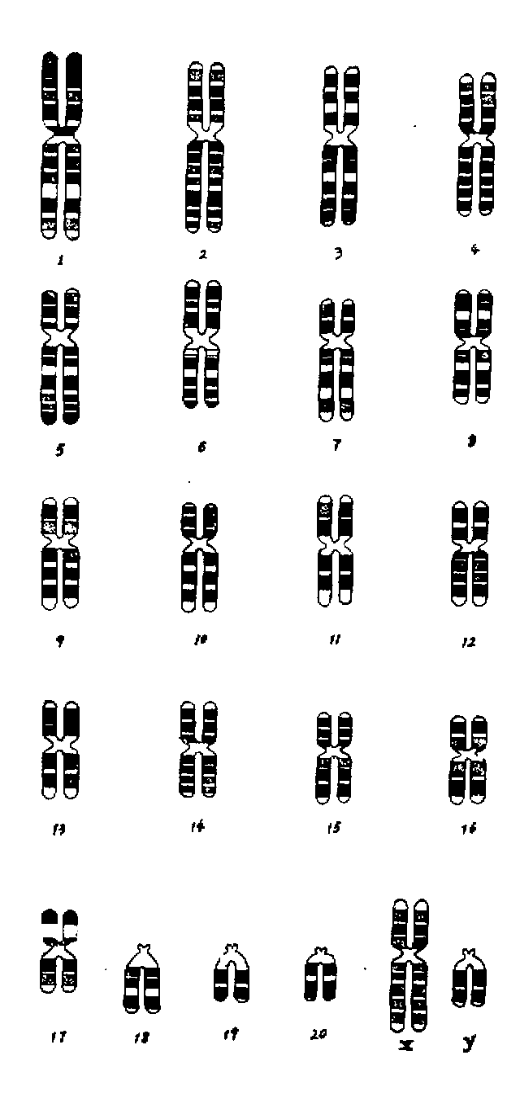


图2　大熊猫G带模式图

Fig 2　G-banding idiogram of the giant panda

在两条强带之间有一条阴性带。

No.3染色体　为中着丝粒染色体。短臂有三条强带，三条强带之间有两条阴性带。长臂近侧有两条强带，中部有一条较宽的阴性带，远侧有三条强带。

No.4染色体　为中着丝粒染色体。短臂近侧有两条强带，远侧有两条中强带。长臂有五条分布较均匀的强带。

No.5 染色体 为亚中着丝粒染色体。短臂远侧有两条强带，近侧有一条较窄的强带。长臂近侧有两条窄的强带，中部有两条较宽的阴性带，两条阴性带之间有一条较宽的强带，远侧有两条中强带，末端为一条强带。

No.6 染色体 为中着丝粒染色体。短臂有两条较宽的强带，两个强带之间有一条中强带。长臂近侧有两条强带，中部有一条中强带，远侧有三条强带。

No.7 染色体 为亚中着丝粒染色体。短臂有两条较宽的强带。长臂近侧有两条较窄的强带，中部有两条阴性带，两条阴性带之间有一条较宽的强带，远侧有两条窄的强带。

No.8 染色体 为中着丝粒染色体。短臂近侧有两条强带，远侧有两条强带，中部为一条阴性带。长臂近侧有两条窄的强带，中部有一条阴性带，远侧有一条较宽的强带和一条中强带。

No.9 染色体 为亚中着丝粒染色体。短臂近侧有一条较宽的中强带，远侧有一条宽的强带。长臂有三条强带，三条强带之间有三条阴性带。

No.10染色体 为亚中着丝粒染色体。短臂中部有一条强带，近侧和远侧各有一条中强带。长臂三条强带，三条强带之间有两条阴性带。

No.11染色体 为中着丝粒染色体。短臂远侧有一条中强带，近侧有一条强带。长臂有两条强带，两条强带之间有一条阴性带。

No.12染色体 为中着丝粒染色体。短臂有两条强带，两条强带之间为一条阴性带。长臂近着丝粒处有一条强带，中部有两条中强带，远侧有一条较宽的强带。

No.13染色体 为中着丝粒染色体。短臂远侧有一条较宽的强带，中部有一条窄的阴性带，近侧有一条强带。长臂近侧有一条较宽的强带，中部有一条较宽的阴性带，远侧有一条强带。

No.14染色体 为中着丝粒染色体。短臂中部和远侧有两条强带，近侧有一条中强带。长臂近侧有两条强带，远侧有两条中强带。

No.15染色体 为中着丝粒染色体。短臂中部和近侧有两条强带，近侧有一条中强带。长臂近侧有一条中强带，中部和远侧有两条强带。

No.16染色体 为中着丝粒染色体。短臂远侧有一条较宽的强带，近侧有一条中强带。长臂近侧有一条较宽的中强带，远侧有一条较宽的强带。

No.17染色体 为近端着丝粒染色体。短臂近侧有一条窄的强带，具有大的次缢痕和随体。长臂近侧为一条宽的强带，远侧为一条中强带。

No.18染色体 为近端着丝粒染色体。有时可见微小短臂。长臂近侧有两条强带，远侧有一条强带，中部有一条窄的阴性带。

No.19染色体 为近端着丝粒染色体。有时可见微小短臂。长臂有两条强带。

No.20染色体 为近端着丝粒染色体。有时可见微小短臂。长臂近侧有一条强带，远侧有一条较宽的强带。

X染色体 为亚中着丝粒染色体。短臂近侧和远侧各为一条中强带，中部有一条强带。长臂近侧有一条中强带和一条强带，中部和远侧有三条中强带。

Y染色体 为近端着丝粒染色体。可见微小短臂。长臂有两条强带。

（二）C带核型（分析了四个个体的23个细胞）

如图3所示，大熊猫的42条染色体均显示着丝粒C带，其中No.17的染色体C带最显著。Y染色体C带区域广泛十分显著，几乎占据整个长臂。

大熊猫13分裂相（5♀♀，8♂♂）的相对长度和着丝粒指数。

染色体号数	相对长度±S.E.	着丝粒指数±S.E.
1	8.04±0.085	46.95±0.629
2	7.66±0.163	43.41±0.704
3	6.62±0.127	45.12±0.680
4	6.12±0.110	42.47±1.186
5	5.85±0.108	31.84±0.846
6	5.77±0.081	44.97±1.045
7	5.47±0.107	32.22±0.783
8	5.22±0.121	40.88±1.006
9	4.92±0.101	36.03±0.693
10	4.92±0.069	43.02±1.394
11	4.62±0.082	45.12±0.915
12	4.44±0.089	37.84±1.173
13	4.36±0.074	40.80±1.007
14	4.14±0.060	45.44±1.082
15	3.90±0.074	41.81±1.059
16	3.76±0.058	45.98±0.731
17	3.54±0.150	
18	2.13±0.047	
19	1.90±0.047	
20	1.79±0.036	
x	5.51±0.083	40.36±0.606

（三）Ag—NORs

Ag—NORs在雌雄个体均定位在No.17对染色体的次缢痕区，在两性个体之间无明显差异，所以在分析结果时未区分性别。统计四只个体58个细胞，显示一个Ag—NORs者有27个细胞〔图4 A〕，占46.6%；显示2个Ag—NORs者有31个细胞〔图4 B〕，占53.4%。在58个细胞中发生随体联合者有8个〔图4 C〕，占14%。间期核显示的Ag—NORs数目与中期相显示的Ag—NORs有平行的关系。

实验中观察到在有丝分裂后期具有Ag—NORs的染色体着丝粒晚分离的现象〔图4 D〕。

讨论

（一）根据四只个体20个细胞G带染色体分析，和 Wurster—Hill（1980）等人所报告结果不同的是：No.16染色体并不表现出总是模糊不清的显带形态。包括Y染色体在内，所有21对染色体均能显示比较清晰而且恒定的G带核型，重复性较好。

（二）C带技术是显示染色体结构异染色质区的主要方法之一。根据C带核型研究，发现大熊猫的结构异染色质主要表现为着丝粒区异染色质，虽然其含量较少，但只要实验条件合适，每条染色体均可显示着丝粒C带，其中No.17对染色体具次缢痕和随体，被称为大熊猫核型的标志染色体，与其他染色体相比，标志染色体着丝粒C带明显，说明富含异染色质。上述结果，并不像 Warster—Hill 等人所称C带仅存在于No.2、7、9、11、15、17、18 和20等八对染色体的着丝粒区。此外，与 Wurster—Hill 等人结果相反，Y染色体长臂同样表现出明显的异染色质化。

一般认为，在生物进化过程中，结构异染色质是一种能促进核型进化的遗传结构。因为它不含有结构基因，所以在核型进化过程中，结构异染色质区允许发生染色体重排而又不严重危害其生物个体。大熊猫染色体的结构异染色质含量少，且分布基本局限于着丝粒区，这可能正是大熊猫在食肉目动物的进化中，非常保守，独居一科（Ailuropodidae），分布狭窄，被称为“活化石”的遗传根据之一。

（三）银染技术是特异显示 NORs 的有效方法之一，Ag—NORs 不仅反映了 rRNA 基因的染色体定位，而且它的染色变异性还反映了间期核 rRNA 基因活性的差别。统计分析四只个体的58个细胞，发现 Ag—NORs 在不同个体间及同一个体不同细胞间表现出数目上的多态现象，有大约14%的细胞可见Ag—NOR融合在一起，这直接证明了No.17对染色体时而发生随体联合现象。

此外，在有丝分裂后期相所观察到的标志染色体着丝粒迟分离的情况，这与其他动物（包括人在内），如中国仓鼠、普通鼷（有袋类）、湖蛙以及人等所见到的情况相似（Vig，1984），说明一个染色体组中，其后期染色体的着丝粒分离是非随机的、有顺序的、在遗传上是受控制的。

参考文献

邓承宗等 1980 自然杂志 9：720—721
陈文元等 1984 大熊猫论文集 四川科技出版社 待发表
Newnham, R. E. and Davidson, W. M. 1966 *Cytogenetics* 5：153—163
Vig, B. K. 1984 *Hum. Genet.* 68：239—243
Wurster-Hill, D. H. and Bush, M. 1980 *Cytogenet. Cell Genet.* 27：147—154
四川大学生物系细胞研究室 1984 动物学研究 5(1)增刊，13—23

STUDY ON THE BANDED CHROMOSOMES OF THE GIANT PANDA (*Ailuropoda melanolenca*)

Chen Wenyuan Wang Xizhong Wang Zishu

(Department of Biology, Sichuan University chengdu)

He Guangxin Ye Zhiyong

(Zoological Garden of Chengdu)

The banded chromosomes G-banding, C-banding and Ag-staining technique of the giant panda (*Ailuropoda melanolenca*) have been studied. The results are as follows:

1. The diploid chromosome number is 42 in the giant panda. The distinctive G-banding patterns are clearly discernible in almost every chromosome. The banded idiogram based on the analysis of the banded chromosomes has been determined.

2. There is little heterochromatin revealed by C-banding. All the chromosomes have centromeric heterochromatin. The maker chromosomes (No. 17) have well-developed C bands showing the most prominent heterochromatin.

3. In the karyotype of the giant panda, Ag-NORs is the only the secondary constitution of the maker chromosomes. The number of Ag-NORs varies among the different individuals or metaphase analyzed. The satellite association has been demonstrated based on the fusion of Ag-NORs. Besides, later separation of centromere was noticed in the maker chromosomes during anaphase of mitosis.

Key words *Ailuropoda melanolenca* **Banded chromosomes Rare animals**

图版 I

1 2 3 4 5 6 7

8 9 10 11 12 13 14

15 16 17 18 19 20

XX XY



图 1 雌性大熊猫G带核型（XY染色体来自另一雄性个体）

Fig 1 G-banding karyotype of female giant panda (XY Chromosome from another male individual)

图版 II



图 3　雄性大熊猫C 带核型

Fig 3　C-banding karyotype of male giant panda

图版 Ⅱ

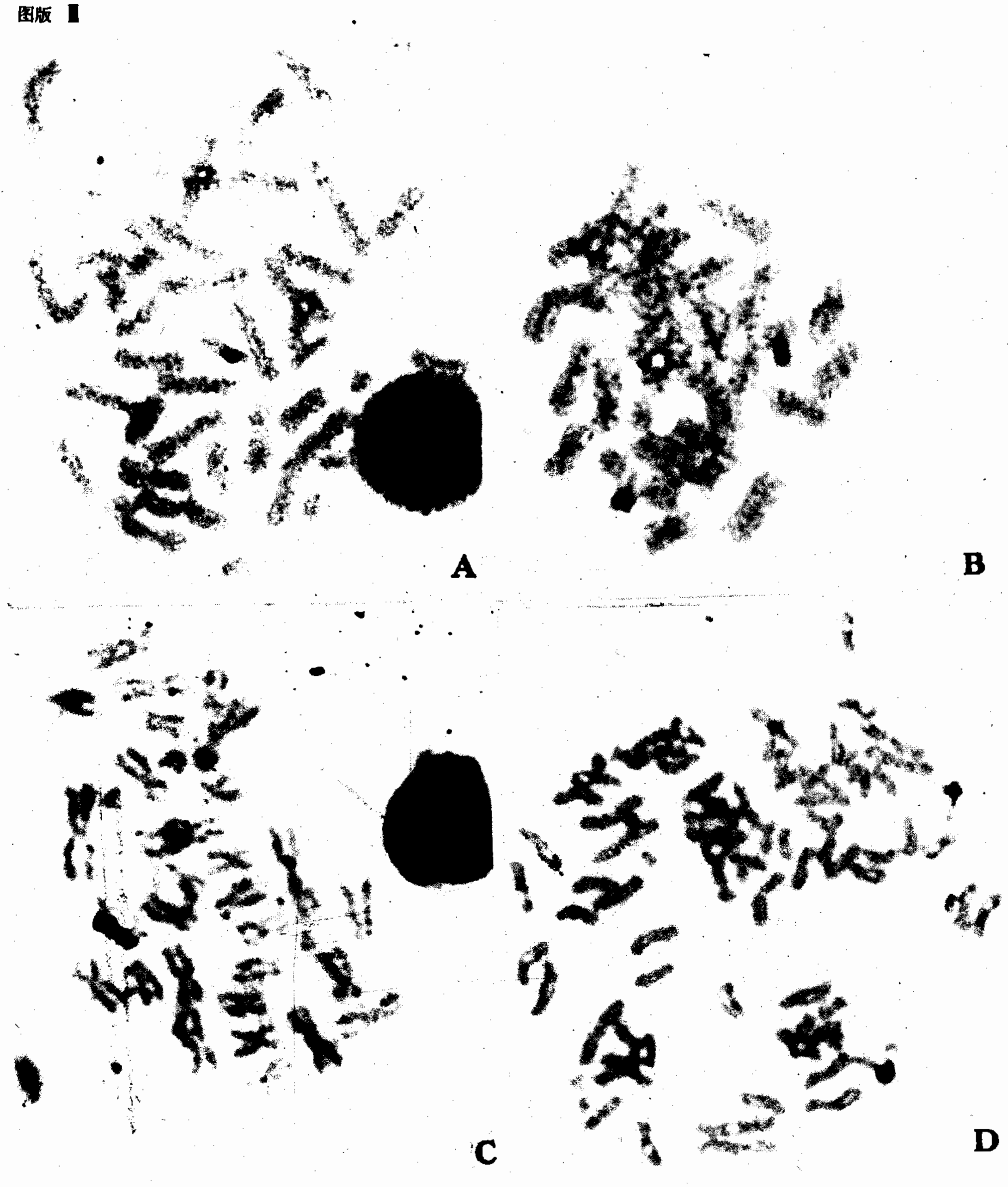


图4 大熊猫银染核仁组成区 Silver-stained NOR of the giant panda

A 中期相显示一个Ag－NOR A metaphase plate showing one Ag－NOR

B 中期相显示二个Ag－NORs B metaphase plate showing two Ag－NORs

C 中期相显示随体联合 C metaphase plate showing satellite association

D 17号染色体具Ag－NORs 显示迟分离 D №17 Chromosomes with Ag－NORs showing later separation